

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-346918

(43) 公開日 平成4年(1992)12月2日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K .9/127		F 7329-4C		
		A 7329-4C		
45/00	ADU	8415-4C		
// A 6 1 K 39/395		Y 8413-4C		

審査請求 未請求 請求項の数7 (全 8 頁)

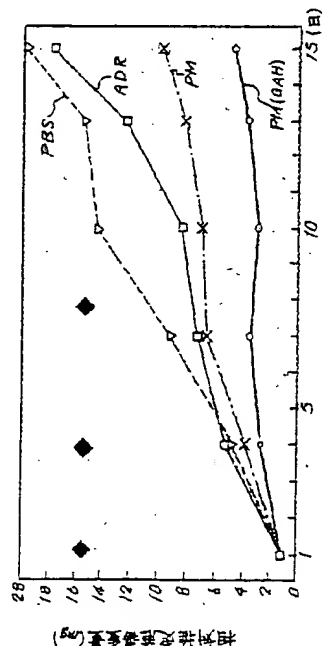
(21) 出願番号	特願平3-118762	(71) 出願人	000005968 三菱化成株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22) 出願日	平成3年(1991)5月23日	(72) 発明者	田川 俊明 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	細川 斉子 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(72) 発明者	長池 一博 神奈川県横浜市緑区鴨志田町1000番地 三 菱化成株式会社総合研究所内
		(74) 代理人	弁理士 長谷川 一 (外1名)

(54) 【発明の名称】 薬剤含有タンパク質結合リボソーム

(57) 【要約】

【構成】 抗癌剤等の薬剤を内包するリボソーム表面のマレイミド残基に、チオール化抗体及びチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物が各々のチオール基を介して結合した薬剤含有タンパク質結合リボソーム。

【効果】 肝臓、脾臓等の網内系器官での非特異的取り込みを抑制するので、特に癌治療剤として有効である。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 薬剤を内包するリボソーム表面のマレイミド残基と、各々のチオール基を介して結合するタンパク質及びポリアルキレングリコール部分を含む化合物残基を有することを特徴とする薬剤含有タンパク質結合リボソーム。

【請求項2】 タンパク質が抗体である請求項1記載の薬剤含有タンパク質結合リボソーム。

【請求項3】 リボソームが、ジバルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール及びマレイミド化ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンから成る請求項1記載の薬剤含有タンパク質結合リボソーム。

【請求項4】 マレイミド化ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンが、N-( $\gamma$ -マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミドとジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンとを反応させて得られるものである請求項2記載の薬剤含有タンパク質結合リボソーム。

【請求項5】 マレイミド残基とチオール基を介して結合するタンパク質が、リボソーム表面のマレイミド残基とチオール化タンパク質とを反応させて得られるものである請求項1記載の薬剤含有タンパク質結合リボソーム。

【請求項6】 マレイミド残基とチオール基を介して結合するポリアルキレングリコール部分を含む化合物残基が、リボソーム表面のマレイミド残基とチオール化ポリアルキレングリコールとを反応させて得られるものである請求項1記載の薬剤含有タンパク質結合リボソーム。

【請求項7】 抗腫瘍性物質を内包するリボソーム表面のマレイミド残基とチオール基を介して結合してなる抗体及びポリアルキレングリコール残基を有することを特徴とする抗腫瘍薬剤。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 癌等の各種疾病に対する選択的化学療法剤に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする問題点】 タンパク質の反応性、特に抗体の特異的な反応性を利用して薬剤を必要とされる作用部位に集積させるミサイル療法剤は、その高い効果と副作用の低減が期待され、癌治療をはじめ多くの医薬分野で期待を集めている。ミサイル療法剤の実現にむけては抗体と薬剤の複合化技術の確立は重要な点の一つである。これまで抗体と薬剤の結合は化学的に薬剤を修飾して結合する方法、すなわち抗体と薬剤を直接結合する方法や、デキストラン等の水溶性高分子を介して結合する方法等が試みられている。しかし、それらの方法では抗体1分子あたりに結合できる薬剤量が少ないこと、また薬剤の修飾により活性が低下するなどの問題が指摘されている。一方薬剤を修飾することな

く大量に運ぶ手段として、リボソームに薬剤を封入しその表面に抗体を結合する方法、すなわち抗体結合リボソームが提案されている。

【0003】 癌治療の分野でも抗癌剤封入抗体結合リボソームが作製され、その優れた抗癌効果が多くの研究機関から報告されてきた(Konno et al Cancer Res. 47 4471 (1987)、橋本ら特開昭58-134032号公報)。しかし、同時に抗体結合リボソームの問題も指摘されている。つまり、投与した抗体結合リボソームの多くが肝臓、脾臓などの網内系器官で捕捉され十分な効果が発揮されにくいという問題点である(Hashimoto et al. Cancer Res. 43 5328 (1983))。

【0004】 一方、リボソームの一般的性質、すなわち内封物のもれ、凝集、及び網内系器官での捕捉などの性質を改良する方法としてリボソームにポリエチレングリコールなどをつけることが知られている(特開平1-249717号公報、特開平2-149512号公報、Alexander L. Klibanov et al FEBS letters 268 235 (1990))。

【0005】 しかし、この方法は、ポリエチレングリコールと長鎖脂肪酸等の化合物を他のリボソーム構成脂質に添加し作製時にポリエチレングリコール層をリボソーム表面に形成する方法または、リボソーム表面に導入したアミノ基とポリエチレングリコールを反応させる方法であり、抗体結合リボソームに適用した場合、抗体の結合が妨げられる、抗体の失活がおこる等の問題が考えられる。そのため従来のポリエチレングリコール結合方法は、必ずしも抗体結合リボソームへの適用は意図されていなかった。

【0006】

【問題点を解決するための手段】 本発明者らは、網内系での取り込みの改良された薬剤含有抗体結合リボソームを提供すべく鋭意検討した結果、マレイミド基を有するリボソームにまずチオール基を付与したタンパク質(チオール化タンパク質)を反応させ、次いで、残存マレイミド基にチオール基を付与したポリアルキレングリコール(チオール化ポリアルキレングリコール)部分を含む化合物を反応させることによって目的を達成することを見いだした。

【0007】 即ち本発明の要旨は、薬剤を内包するリボソーム表面のマレイミド残基と、各々のチオール基を介して結合するタンパク質及びポリアルキレングリコール部分を含む化合物残基を有することを特徴とする薬剤含有タンパク質結合リボソームに存する。以下に本発明について詳細に説明する。

(1) リボソーム

① リボソームの構成成分はフォスファチジルコリン、コ

3

レステロール、及びマレイミド化フォスファチジルエタノールアミンから成るが、さらに電荷をあたえる物質としてジバルミトイルフォスファチジン酸 (DPPA) のようなフォスファチジン酸等を加えてもよい。

【0008】好ましいものとして、ジバルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC)、コレステロール (Chol) 及びマレイミド化ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン (マレイミド化DPPC) から構成されるリボソームが挙げられる。②マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンはアミノ基に反応性を有するマレイミド含有化合物とフォスファチジルエタノールアミン (PE) のアミノ基との反応により得られる。マレイミド含有化合物としてはN-( $\gamma$ -マレイミドカプロイルオキシ) スクシンイミド、N-サクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル) ブチレート、N-サクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル) プロピオネート、N-( $\gamma$ -マレイミドブチリルオキシ) スクシンイミド等が、PEとしてはジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等が挙げられる。

【0009】③各構成成分の使用割合はフォスファチジルコリン1mol に対しコレステロールは0.3-1mol、好ましくは0.4-0.6mol、マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンは0.01-0.2mol、好ましくは0.02-0.1mol、フォスファチジン酸を加える場合は0-0.4mol、好ましくは0-0.15molの組成比で用いられる。

【0010】④リボソームの製造方法には、公知の方法を用いることができる。例えば、溶媒を除去した脂質混合物を水和しホモジナイザー等で乳化後、凍結融解しマルチラメラリボソームを得る。さらに適当な粒径に調整する為には超音波処理、高速ホモジナイズ、あるいは均一ポアを持つメンブランで加圧ろ過する方法 (Hope M. J et al Biochimica et Biophysica Acta 812, 55 (1985)) 等で調整する。

【0011】このとき好ましいサイズとして300nm以下、好ましくは30nmから20nmのリボソームが選択される。

## (2) 薬剤

①薬剤としてはアドリアマイシン、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エビルピシン、メトトレキサート、5FU、アクラシノマイシン等の抗癌剤、ゲンタマイシン等のアミノ配糖体やスルベニシリン等の $\beta$ ラクタム系抗生物質、リシンA、ジフテリアトキシン等の毒素、HIVやras遺伝子に対するアンチセンスRNA、アクチノブラノン (Actinoplan R-304から産出されるPolycyclic xanthone類) (K. Kobayashi et al J. Antibiotics 41 741 (1988)) 等を用いることができる。

、【0012】②薬剤のリボソームへの封入は、水溶性薬剤の場合は脂質を薬剤水溶液で水和することで、脂溶性薬剤の場合はいったん揮発性有機溶媒に薬剤と脂質を混合し、溶媒を留去後得られる薬剤、脂質混合物を水和することでリボソームに包埋することができる。またアドリアマイシン、ダウノマイシン、エビルピシンについては、pH勾配を利用したりモートローディング法 (Lawrence D. Mayer et al. Cancer Res. 49, 5922, (1989)) を用いて封入することもできる。

## (3) チオール化タンパク質

①リボソームに結合するタンパク質としては、抗体、FGF、EGF等の種々の生理活性物質が用いられるが、好ましくは抗体が挙げられる。抗体は治療対象となる組織、細胞、細菌、ウイルス等と反応性を有する抗体であり、各種動物のポリクロナール抗体、マウスモノクロナール抗体、ヒトマウスのキメラ抗体、ヒトモノクロナール抗体等を用いることができる。異種動物のタンパク質でない点からヒト型モノクロナール抗体がより望ましい。

【0013】②タンパク質へのチオール基の付与は、タンパク質のアミノ基に対し通常タンパク質のチオール化に用いるN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP) (Carlsson, J. et al Biochem. J. 173, 723, (1978)) やイミノチオラン、メルカプトアルキルイミデート (Traut, R. R. et al Biochemistry 12, 3266 (1973)) 等の化合物を用いて行なう方法、また抗体の場合は、内在性ジチオール基を還元しチオール基とする方法も用いられる。抗体とリボソームとの結合においては内在性チオール基を用いる後者の方法が活性維持の点からより好ましい。IgGを用いる場合はペプシン等の酵素でF(ab')<sub>2</sub>化しさらにジチオスレイトール等で還元して得られるFab'に生じるチオール基をリボソームとの結合反応に供する (Martin, F. J. et al Biochemistry 20, 4229 (1981))。IgMの場合は、Millerらの方法 (J. Biol. Chem 257, 286 (1965)) に準じ、穏和な条件でJ鎖を還元して得られるIgMsのFc部分のチオール基をリボソームとの結合に供する。

【0014】③マレイミド基含有リボソームとチオール化タンパク質の結合は中性の緩衝液 (pH6.5-7.5) 中2-16時間反応することで達成される。(4) チオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物①上記化合物のポリアルキレングリコール部分としてはポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールが挙げられる。好ましくは、ポリエチレングリコールであり、さらにその重合度は20から400のものが好まし

い。

【0015】②ポリアルキレングリコールにチオール基を導入するためには、水酸基、アミノ基、カルボキシル基及びトリアジンに対し通常用いられる各種チオール化反応を用いることができる。以下にポリエチレングリコールの場合の具体例を示すがそれによって限定されるものではない。モノメトキシポリオキシエチレンアミンと各種チオールカルボン酸を脱水縮合する方法、モノメトキシポリオキシエチレンアミンにSPDPでジチオピリジンを導入しさらに還元する方法、モノメトキシポリオキシエチレンアミンにイミノチオランによりチオールを導入する方法、モノメトキシポリオキシエチレンカルボン酸の活性エステルと各種チオールアミンを結合させる方法、ポリエチレングリコールトリアジン誘導体をチオールアミンと結合する方法、等がある。

【0016】さらに具体的に述べれば後述の実施例示す様に、2, 4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性化PEG2(生化学工業))をシステインと反応させ、さらに還元しシステイン結合活性化PEG2を得ることができる。

(5) リボソーム表面へのチオール化タンパク質及びチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物の担持

リボソーム表面に抗体及びポリエチレングリコールを結合あるいは修飾させるに際しては、先ず過剰量のマレイミド基を有するリボソームにチオール化タンパク質を加え中性の緩衝液中で反応させる。チオール化抗体を例にとると、この時、チオール化抗体はマレイミド基1molに対し0.1%molから20%molを用いる。次いで残存マレイミド基に対し過剰量のチオール化ポリアルキレングリコール、好ましくは2倍等量以上を加え抗体結合ポリアルキレングリコール修飾リボソームをえる。この過程において、過剰な残存マレイミド基のブロック効果も同時に達成することができる。

(6) 薬剤含有タンパク質結合リボソームの利用方法  
上記のようにして得られた薬剤含有タンパク質結合リボソーム、例えば、アドリアマイシン封入抗体結合PEG修飾リボソームは、公知の方法つまり、脱水法(特開平2-502348号公報)、安定化剤を加え液剤として用いる方法(特開昭64-9331号公報)、凍結乾燥法(特開昭64-9931号公報)等により製剤化できる。

【0017】このようにして製剤化されたものは、癌等の各種疾病に対し血管内投与法や膀胱内、腹腔内等、局所投与等の方法で用いることができる。投与量は、アドリアマイシン封入体を例に取れば、アドリアマイシン量として50mg/kg以下、好ましくは10mg/kg以下、より好ましくは5mg/kg以下で用いることができる。

【0018】

【実施例】以下に実施例を示し、さらに詳細な説明を行

うが、本発明はこれらに限定されるわけではない。

実施例1 PEG修飾アドリアマイシン封入リボソームの網内系回避効果の確認チオール化ポリエチレングリコールの作製

レーシチン48mgを0.4Mほう酸緩衝液10mlに溶解し、2, 4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性化PEG2(生化学工業))200mgを加え室温で一晩反応した。得られたシステイン結合PEGにジチオスレート(DTT)62mgを加え37℃で6時間反応させることでシステイン結合PEGを含む溶液を得た。さらに反応液をゲル濾過(GH-25生化学工業)等で脱塩し10mMリン酸緩衝液pH7.4、0.15M NaCl(PBS)に置換した後PBSで平衡化したチオプロピルセファロースCL6B(ファルマシア)7mlに添加し、非結合物をPBSで洗浄除去した。ゲルに結合したシステイン結合PEGを50mM DTTを含むPBSで溶出後、ゲル濾過等で余剰のDTTを脱塩除去し標品を得た。

【0019】マレイミド化-ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンの作製ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン127mg、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド(EMCS)80mg、トリエチルアミン44mlを5/1のクロロホルム、メタノール溶液を加え窒素気流下で反応した。3時間後、さらに20mgのEMCSを追加しさらに室温3時間反応した。

【0020】反応溶液のニンヒドリン反応が陰性になったことを確認後、減圧乾固し、少量のクロロホルムに再溶解した。マレイミド化ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミンはUNISIL(ガスクロ工業)を用いたクロマトグラフィーで精製した。クロロホルムで平衡化した同カラムに添加しクロロホルム/メタノール=10/1の溶離液で展開し目的物質を得た。

【0021】マレイミド含有アドリアマイシン封入リボソームの作製

DPPE/cholesterol/DPPA/マレイミド化DPPE=18/10/2/0.5(mol比)からなる固形脂質混合物(日本精化)100mgに0.4Mクエン酸緩衝液pH4を1ml加え攪拌し、さらに凍結融解を5回繰り返し水和することによりマルチラメラリボソームを作製した。ついでマルチラメラリボソームを200nmのポアサイズをもつポリカーボネート膜(スクレオポア、マイクロサイエンス)を装着した加圧装置(extruder; Lipex Biomembranes)で60℃に加温しつつ10回加圧濾過を繰り返すことで整粒されたりボソームを得た。このリボソーム溶液を1M NaOH溶液中で中和し60℃に加温しつつ脂質量の1/10重量のアドリアマイシン(協和発酵)を加えた。リボソーム内外のpH勾配に従って97%以上のアドリアマイシンが能動的にリボソームに封入され、マレイミド含有

アドリアマイシン封入リボソームが作製された。

【0022】マレイミド含有リボソームへのチオール化PEGの導入上記マレイミド含有リボソームにチオール化PEGを5 $\mu$ mol加え、PBS中室温で6時間反応することによりPEG修飾アドリアマイシン封入リボソームを作製した。さらにセファロースCL6B（ファルマシア）でゲル濾過し未反応のシステイン結合PEGを分離後、評価実験用に供された。

【0023】体内動態の検討

作製したリボソームをマウス尾静脈からアドリアマイシン\*10

\* 換算5mg/kg投与し30分後に屠殺し摘出した各臓器のアドリアマイシンをkonnoらの方法に従って抽出し定量した。すなわち各臓器を0.3M塩酸50%エタノール中でホモジナイズし、加温後、遠心上清をE $\times$ 490nm、Em590nmの蛍光で測定した。

【0024】表1に示すように肝臓、脾臓のアドリアマイシン量の低下及び血中での高い維持結果が認められた。

【0025】

【表1】

投与30分後の各臓器のアドリアマイシン ( $\mu$ g/g tissue)

	free ADR	lip=ADR	PEG-lip=ADR
血液	0.2	8.7	17.8
肝臓	18.2	31.8	17.2
脾臓	7.2	110.1	90.6
肺	7.9	4.2	5.5
心臓	3.2	1.5	3.5
腎臓	1.4	0.3	0.5
脳	0	0.1	0.3

【0026】実施例2 抗体結合PEG修飾リボソームの反応性の確認

蛍光マーカーである0.1M 6-カルボキシルオレセイン1mlをDPPC/cholesterol/マレイミド化DPPE 18/10/0.5 (mol比) からなる固形脂質混合物（日本精化）を100 $\mu$ g加え実施例1に示す方法で水和し整粒し、マレイミド含有蛍光色素封入リボソームを得た。

【0027】チオール化抗体の作製

抗腫瘍マウスモノクローナル抗体 (IgG) を0.1M酢酸緩衝液pH3.5で1/40mol量のペプシン (Coope Biomedical) を加え37 $^{\circ}$ Cで一晩反応させF(ab')<sub>2</sub>に切断した。さらに陽イオン交換樹脂 (mono S, ファルマシア) によるクロマト分離でF(ab')<sub>2</sub>を単離した。分離は0.1M酢酸緩衝液pH4.0中0Mから1.0M NaClのlinear gradientにより行った。

【0028】さらにFab'に還元するため0.15M NaClを含む0.1M酢酸緩衝液pH4.5で、抗体1mgにつき10%DTT12 $\mu$ lを加え室温で80分間放置した。反応終了後PBSに平衡化したゲル濾過カラム (PD-10ファルマシア) で脱塩しFab'を調製した。上記脂質100 $\mu$ gから得られるリボソームにFab' 5 $\mu$ gを加え37 $^{\circ}$ Cで8時間反応させ、さらに5 $\mu$ molのチオール化ポリエチレングリコールを加えることで過剰のマレイミドと反応させ抗体結合PEG修飾リボソームをえた。

【0029】

PEG修飾抗体結合リボソームの結合活性確認

用いたモノクローナル抗体との反応性が確認されているヒト胃癌細胞株MKN45を用いPEG修飾抗体結合リボソームの反応性をin vitroで確認した。トリ

プシンで浮遊化したMKN45 8 $\times$ 10<sup>5</sup> コに上記カルボキシルオレセイン封入抗体結合PEG修飾リボソームをくわえ90%ヒト非動化血清中37 $^{\circ}$ Cで230分反応した。細胞の遠心ペレットをPBSで洗浄後、60 $^{\circ}$ Cで10%triton $\times$ 100でカルボキシルオレセインを遊離させ蛍光測定により細胞との結合量を算出した。

【0030】図1に示すように抗体結合PEG修飾リボソームにおいても対象細胞との高い反応性が認められた。

実施例3 アドリアマイシン封入モノクローナル抗体結合PEG修飾リボソームの薬効確認

DPPC/cholesterol/マレイミド化DPPE=18/10/0.5 (mol比) からなる固形脂質混合物を実施例1に示す方法で処理しアドリアマイシン封入マレイミド含有リボソームを得た。

【0031】ヒトモノクローナル抗体 (IgG) を用いて、またその時、ペプシン切断法のpHを4.0にすること以外は実施例2に示す方法でFab'化抗体を得、リボソームとの結合に共した。さらに同様にチオール化PEGで修飾しアドリアマイシン封入ヒトモノクローナル抗体結合PEG修飾リボソームを得た。ヒト胃癌細胞株移植ヌードマウス系をもちいた薬効評価本抗体とin vitroで反応性が認められまたin vivoヌードマウス移植系で集積性が認められるヒト胃癌細胞株MKN45を用い抗腫瘍効果を検討した。

【0032】治療実験は培養したMKN45 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個をヌードマウス皮下に移植し10日後、腫瘍重量が約100mgになった時点から開始した。治療開始1日目、4日目及び9日目にアドリアマイシン換算で5mg/kgを尾静脈投与した。その腫瘍増殖の経時変化を測定するため、バッテリーコロンバス法に従って腫瘍の径 $\times$

短径×長径／2の計算式で推定腫瘍重量を求め、その推移を治療開始時点での腫瘍重量を基準として示した。

【0033】その結果図2に示すようにアドリアマイシン封入モノクローナル抗体結合PEG修飾リボソームの強い抗腫瘍効果が示された。

【0034】

【発明の効果】本発明で得られるリボソームによれば、従来のリボソームで見られたような肝臓、脾臓等の網内系での非特異的取り込みを抑制することができ、選択的化学療法剤、特に癌治療剤として有効である。

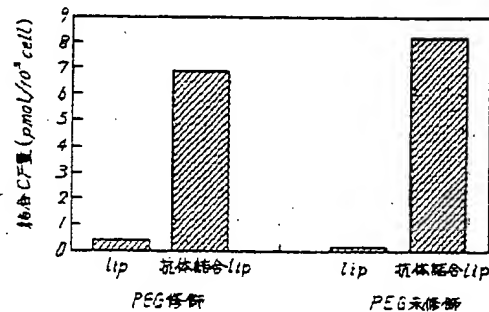
【図面の簡単な説明】

【図1】ヒト胃癌細胞株、MKN45に対する抗体結合リボソームの反応性を、PEG修飾及び未修飾リボソ

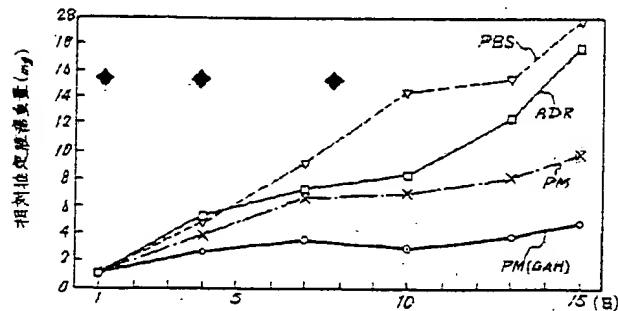
ムについて示したものである。縦軸は、MKN45に対する結合量を、6-カルボキシフルオレッセイン(CF)量で示した。図中、lipはCF封入リボソームを、抗体結合lipはCF封入抗体結合リボソームを示す。

【図2】ヌードマウス移植癌に対するアドリアマイシン封入抗体結合PEG修飾リボソームの抗腫瘍効果を示した。横軸は治療実験開始後の日数を、縦軸は推定腫瘍重量を示す。図中◆は薬剤投与日を示す。また、PBSはリン酸緩衝生理食塩水を、ADRはアドリアマイシン単独を、PMはアドリアマイシン封入PEG修飾リボソームを、PM(GAH)はアドリアマイシン封入ヒトモノクローナル抗体結合PEG修飾リボソームを示す。

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【提出日】平成4年5月22日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項4

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項4】マレイミド化ジバルミトイルフォスファテジルエタノールアミンが、N-(ε-マレイミドカブ

ロイルオキシ)スクシンイミドとジバルミトイルフォスファテジルエタノールアミンとを反応させて得られるものである請求項3記載の薬剤含有タンパク質結合リボソーム。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0008】好ましいものとして、ジバルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)、コレステロール(Chol)及びマレイミド化ジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン(マレイミド化DPE)から構成されるリボソームが挙げられる。②マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンはアミノ基に反応性を有するマレイミド含有化合物とフォスファチジルエタノールアミン(PE)のアミノ基との反応により得られる。マレイミド含有化合物としてはN-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド、N-サクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、N-サクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)プロピオネート、N-(γ-マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミド等が、PEとしてはジバルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等が挙げられる。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】このとき好ましいサイズとして300nm以下、好ましくは30nmから200nmのリボソームが選択される。

## (2) 薬剤

①薬剤としてはアドリアマイシン、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エビルピシン、メトトレキサート、5FU、アクラシノマイシン等の抗癌剤、ゲンタマイシン等のアミノ配糖体やスルベニシリン等のβラクタム系抗生物質、リシンA、ジフテリアトキシシン等の毒素、HIVやras遺伝子に対するアンチセンスRNA、アクチノブラノン(Actinoplan R-304から産出されるPolycyclic xanthone類)(K. Kobayashi et al. J. Antibiotics 41:741 (1988))等を用いることができる。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正内容】

【0015】②ポリアルキレングリコールにチオール基を導入するためには、水酸基、アミノ基、カルボキシル基及びトリアジンに対し通常用いられる各種チオール化反応を用いることができる。以下にポリエチレングリコールの場合の具体例を示すがそれによって限定されるものではない。モノメトキシポリオキシエチレンアミンと各種チオールカルボン酸を脱水縮合する方法、モノメトキシポリオキシエチレンアミンにSPDPで**ビリジルジ**チオプロピオニル基を導入しさらに還元する方法、モノ

メトキシポリオキシエチレンアミンにイミノチオランによりチオールを導入する方法、モノメトキシポリオキシエチレンカルボン酸の活性エステルと各種チオールアミンを結合させる方法、ポリエチレングリコールトリアジン誘導体をチオールアミンと結合する方法、等がある。

## 【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】さらに具体的に述べれば後述の実施例に示す様に2,4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性化PEG2(生化学工業))をシスチンと反応させ、さらに還元シスチン結合活性化PEG2を得ることができる。

(5) リボソーム表面へのチオール化タンパク質及びチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物の担持

リボソーム表面にチオール化タンパク質及びチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を結合あるいは修飾させるに際しては、先ず過剰量のマレイミド基を有するリボソームにチオール化タンパク質を加え中性の緩衝液中で反応させる。チオール化抗体を例にとると、この時、チオール化抗体はマレイミド基1molに対し0.1%molから20%molを用いる。次いで残存マレイミド基に対し過剰量のチオール化ポリアルキレングリコール、好ましくは2倍等量以上を加え抗体結合ポリアルキレングリコール修飾リボソームをえる。この過程において、過剰な残存マレイミド基のブロック効果も同時に達成することができる。

## (6) 薬剤含有タンパク質結合リボソームの利用方法

上記のようにして得られた薬剤含有タンパク質結合リボソーム、例えば、アドリアマイシン封入抗体結合PEG修飾リボソームは、公知の方法つまり、脱水法(特表平2-502348号公報)、安定化剤を加え液剤として用いる方法(特開昭64-9331号公報)、凍結乾燥法(特開昭64-9931号公報)等により製剤化できる。

## 【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】

【実施例】以下に実施例を示し、さらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されるわけではない。

実施例1 PEG修飾アドリアマイシン封入リボソームの網内系回避効果の確認チオール化ポリエチレングリコールの作製

L-シスチン48mgを0.4Mほう酸緩衝液10mlに溶

解し、2、4-ビス（ポリエチレングリコール）-6-クロロ-s-トリアジン（活性化PEG2 生化学工業）200mgを加え室温で一夜反応した。得られたシステイン結合PEGにジチオスレイトール（DTT）62mgを加え37℃で6時間反応させることでシステイン結合PEGを含む溶液を得た。さらに反応液をゲル濾過（GH-25生化学工業）等で脱塩し10mMリン酸緩衝液pH7.4、0.15M NaCl（PBS）に置換した後PBSで平衡化したテオブロビルセファロース6B（ファルマシア）7mlに添加し、非結合物をPBSで洗浄除去した。ゲルに結合したシステイン結合PEGを50mM DTTを含むPBSで溶出後、ゲル濾過等で余剰のDTTを脱塩除去し標品を得た。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正内容】

【0021】マレイミド含有アドリアマイシン封入リボソームの作製

DPPC/cholesterol/DPPA/マレイミド化DPPE = 18/10/2/0.5 (mol 比) からなる固形脂質混合物（日本精化）100mgに0.3Mクエン酸緩衝液pH4を1ml加え攪拌し、さらに凍結融解を5回繰り返し水和することによりマルチラメラリボソームを作製し

た。ついでマルチラメラリボソームを200nmのポアサイズをもつポリカーボネート膜（ヌクレオポア、マイクロサイエンス）を装着した加圧装置（extruder; Lipex Biomembranes）で60℃に加温しつつ10回加圧濾過を繰り返すことで整粒されたリボソームを得た。このリボソーム溶液を1M NaOH溶液で中和し60℃に加温しつつ脂質重量の1/10重量のアドリアマイシン（協和発酵）を加えた。リボソーム内外のpH勾配に従って97%以上のアドリアマイシンが能動的にリボソームに封入され、マレイミド含有アドリアマイシン封入リボソームが作製された。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】治療実験は培養したMKN45 1×10<sup>6</sup>個をヌードマウス皮下に移植し10日後、腫瘍重量が約100mgになった時点から開始した。治療開始1日目、4日目及び8日目にアドリアマイシン換算で5mg/kgを尾静脈投与した。その腫瘍増殖の経時変化を測定するため、バッテリーコロンバス法に従って腫瘍の短径×短径×長径/2の計算式で推定腫瘍重量を求め、その推移を治療開始時点での腫瘍重量を基準として示した。



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成10年(1998)12月15日

【公開番号】特開平4-346918

【公開日】平成4年(1992)12月2日

【年通号数】公開特許公報4-3470

【出願番号】特願平3-118762

【国際特許分類第6版】

A61K 9/127

- 45/00 ADU

// A61K 39/395

【F I】

A61K 9/127 F

A

45/00 ADU

39/395 Y

【手続補正書】

【提出日】平成4年5月22日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】請求項4

【補正方法】変更

【補正内容】

【請求項4】マレイミド化ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンが、N-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミドとジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンとを反応させて得られるものである請求項3記載の薬剤含有タンパク質結合リポソーム。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】好ましいものとして、ジパルミトイルフォスファチジルコリン(DPPC)、コレステロール(Chol)及びマレイミド化ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン(マレイミド化DPPE)から構成されるリポソームが挙げられる。

③マレイミド化フォスファチジルエタノールアミンはアミノ基に反応性を有するマレイミド含有化合物とフォスファチジルエタノールアミン(PE)のアミノ基との反応により得られる。マレイミド含有化合物としてはN-(ε-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミド、N-サクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、N-サクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)プロピオネート、N-(γ-マレイ

ミドブチリルオキシ)スクシンイミド等が、PEとしてはジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等が挙げられる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】このとき好ましいサイズとして300nm以下、好ましくは30nmから200nmのリポソームが選択される。

(2) 薬剤

②薬剤としてはアドリアマイシン、ダウノマイシン、マイトマイシン、シスプラチン、ビンクリスチン、エピルビンシン、メトトレキサート、5FU、アクラシノマイシン等の抗癌剤、ゲンタマイシン等のアミノ配糖体やスルペニシリン等のβラクタム系抗生物質、リシンA、ジフテリアトキシン等の毒素、HIVやras遺伝子に対するアンチセンスRNA、アクチノプラノン(Actinoplane R-304から産出されるPolycyclic xanthone類)(K. Kobayashi et al J. Antibiotics 41 741 (1988))等を用いることができる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正内容】

【0015】③ポリアルキレングリコールにチオール基を導入するためには、水酸基、アミノ基、カルボキシル

基及びトリアジンに対し通常用いられる各種チオール化反応を用いることができる。以下にポリエチレングリコールの場合の具体例を示すがそれによって限定されるものではない。モノメトキシポリオキシエチレンアミンと各種チオールカルボン酸を脱水縮合する方法、モノメトキシポリオキシエチレンアミンにSPDPでピリジルジチオプロピオニル基を導入しさらに還元する方法、モノメトキシポリオキシエチレンアミンにイミノチオランによりチオールを導入する方法、モノメトキシポリオキシエチレンカルボン酸の活性エステルと各種チオールアミンを結合させる方法、ポリエチレングリコールトリアジン誘導体をチオールアミンと結合する方法、等がある。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正内容】

【0016】さらに具体的に述べれば後述の実施例に示す様に、2, 4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性化PEG2(生化学工業))をシステインと反応させ、さらに還元しシステイン結合活性化PEG2を得ることができる。

(5) リポソーム表面へのチオール化タンパク質及びチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物の担持

リポソーム表面にチオール化タンパク質及びチオール化ポリアルキレングリコール部分を含む化合物を結合あるいは修飾させるに際しては、先ず過剰量のマレイミド基を有するリポソームにチオール化タンパク質を加え中性の緩衝液中で反応させる。チオール化抗体を例にとると、この時、チオール化抗体はマレイミド基1mol に対し0.1%mol から20%mol を用いる。次いで残存マレイミド基に対し過剰量のチオール化ポリアルキレングリコール、好ましくは2倍等量以上を加え抗体結合ポリアルキレングリコール修飾リポソームをえる。この過程において、過剰な残存マレイミド基のブロック効果も同時に達成することができる。

(6) 薬剤含有タンパク質結合リポソームの利用方法  
上記のようにして得られた薬剤含有タンパク質結合リポソーム、例えば、アドリアマイシン封入抗体結合PEG修飾リポソームは、公知の方法つまり、脱水法(特表平2-502348号公報)、安定化剤を加え液剤として用いる方法(特開昭64-9331号公報)、凍結乾燥法(特開昭64-9931号公報)等により製剤化できる。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正内容】

【0018】

【実施例】以下に実施例を示し、さらに詳細な説明を行うが、本発明はこれらに限定されるわけではない。

実施例1 PEG修飾アドリアマイシン封入リポソームの網内系回避効果の確認チオール化ポリエチレングリコールの作製

L-システイン48mgを0.4Mほう酸緩衝液10mlに溶解し、2, 4-ビス(ポリエチレングリコール)-6-クロロ-s-トリアジン(活性化PEG2(生化学工業))200mgを加え室温で一夜反応した。得られたシステイン結合PEGにジチオスレイトール(DTT)62mgを加え37℃で6時間反応させることでシステイン結合PEGを含む溶液を得た。さらに反応液をゲル濾過(GH-25生化学工業)等で脱塩し10mMリン酸緩衝液pH7.4、0.15M NaCl(PBS)に置換した後PBSで平衡化したチオプロピルセファロース6B(ファルマシア)7mlに添加し、非結合物をPBSで洗浄除去した。ゲルに結合したシステイン結合PEGを50mM DTTを含むPBSで溶出後、ゲル濾過等で余剰のDTTを脱塩除去し標品を得た。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正内容】

【0021】マレイミド含有アドリアマイシン封入リポソームの作製

DPPC/cholesterol/DPPA/マレイミド化DPPE=18/10/2/0.5(mol比)からなる固形脂質混合物(日本精化)100mgに0.3Mクエン酸緩衝液pH4を1ml加え攪拌し、さらに凍結融解を5回繰り返して水和することによりマルチラメラリポソームを作製した。ついでマルチラメラリポソームを200nmのポアサイズをもつポリカーボネート膜(ヌクレオポア、マイクロサイエンス)を装着した加圧装置(extruder; Lipex Biomembranes)で60℃に加温しつつ10回加圧濾過を繰り返すことで整粒されたリポソームを得た。このリポソーム溶液を1M NaOH溶液中で中和し60℃に加温しつつ脂質重量の1/10重量のアドリアマイシン(協和発酵)を加えた。リポソーム内外のpH勾配に従って97%以上のアドリアマイシンが能動的にリポソームに封入され、マレイミド含有アドリアマイシン封入リポソームが作製された。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】治療実験は培養したMKN45 1×10<sup>6</sup>個をヌードマウス皮下に移植し10日後、腫瘍重量が

約100mgになった時点から開始した。治療開始1日目、4日目及び8日目にアドリアマイシン換算で5mg/kgを尾静脈投与した。その腫瘍増殖の経時変化を測定す\*

\* するため、バッテリーコロンバス法に従って腫瘍の短径×短径×長径/2の計算式で推定腫瘍重量を求め、その推移を治療開始時点での腫瘍重量を基準として示した。

【手続補正書】

【提出日】平成9年7月9日

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

※【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】

※

